

膵癌細胞に対するLAK養子免疫療法の抗腫瘍効果の実験的検討

著者	遊佐 透
号	2779
発行年	1995
URL	http://hdl.handle.net/10097/21211

氏 名（本籍）	遊 ^ゆ 佐 ^さ 透 ^{とおる}
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 第 2779 号
学位授与年月日	平 成 7 年 3 月 8 日
学位授与の条件	学位規則第4条第2項該当
最 終 学 歴	昭 和 62 年 3 月 10 日 福島県立医科大学医学部医学科卒業
学 位 論 文 題 目	膀胱癌細胞に対する LAK 養子免疫療法の抗腫瘍効果の実験的検討

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 松 野 正 紀	教授 佐 竹 正 延
	教授 森 昌 造	

論文内容要旨

【目 的】

脾癌切除術後早期に肝転移予防を目的とした LAK 養子免疫療法の応用を考え、その基礎的な効果を検討するために脾癌症例の末梢血リンパ球から脾癌細胞に対する細胞障害活性を持った LAK 細胞を誘導できるか、誘導方法の違いによる細胞障害活性の差、ヌードマウス移植脾癌細胞に対する LAK 細胞の腫瘍増殖抑制効果について検討した。

【方 法】

脾癌細胞は脾癌症例の手術標本から教室で樹立した PK-1, PK-9 および PK-1 をヌードマウス門脈内に投与して作成した実験肝転移巣から樹立した KLM-1 を用いた。細胞障害活性の標的細胞としては K562, Daudi を用いた。ボランティア健常人の末梢血を 20ml ヘパリン加採血し、比重遠心法にて単核球を分離し、medium に浮遊させた。medium は AIM-V 無血清培地に rIL-2 を 700JRU/ml, 同型ヒト血清を 10%, 75cm² フラスコにて 37°C, 5% CO₂ の条件で培養した。十分な数の effector 細胞数を得るため抗 CD3 抗体 (OKT3) をフラスコにコーティングした。細胞の増殖に従い同じ組成の medium を追加し、7 日間培養した。脾癌症例で術前に成分採血装置 Haemonetics V50 を用いて末梢血リンパ球を得て、これを rIL-2 700JRU/ml 存在下にガス透過性カルチャーバッグを用いて 7 日間培養し細胞障害活性を測定した。また、術前の全身状態が不良な場合には末梢血を 30ml 採血し、健常人と同様に抗 CD3 抗体を固層化したフラスコにて 7 日間培養した。細胞障害活性は 4 時間の ⁵¹Cr 遊離試験にて測定した。標的細胞を 100 μCi Na⁵¹CrO₄ 水溶液中で 1 時間標識し、U 底 96 穴プレートに Effector/Target 比が 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, 2.5 : 1 となるように分注した。LAK 細胞を 2 × 10⁵ 個/ml に調整し、U 底 96 穴プレートに 100 μl ずつ分注した。プレートを 37°C, 5% CO₂ で 4 日間培養し各 well の細胞上清を 100 μl ずつ回収し γ カウンターで放射能 (cpm) を測定した。細胞障害活性は式 1 にて算出した。

$$\% \text{lysis} = \frac{\text{Experimental release} - \text{Spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{Spontaneous release}} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

健常人 LAK 細胞 5 × 10⁶ 個/0.1ml PBS と脾癌細胞 KLM-1 10⁶ 個/0.1ml PBS を混合後直ちにヌードマウスの側腹部皮下に接種し (LAK 群)、接種当日から 3 日間、3.5 × 10⁴ JRU/mouse の rIL-2 を腹腔内投与した。経時的に出現する腫瘍径を測定し、式 2 にて腫瘍体積を求めた。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \text{短径}^2 \times \text{長径} \times 0.4 \quad (\text{式 2})$$

対照として腫瘍細胞 KLM-1 1 × 10⁶ 個/0.2ml PBS を接種した場合 (対照群) の腫瘍体積と

の比から式 3 にて増殖抑制率を求めた。

$$\text{増殖抑制率 (\%)} = \left(1 - \frac{\text{実験群腫瘍体積}}{\text{対照群腫瘍体積}} \right) \times 100 \quad (\text{式 3})$$

また、健常人末梢血単核球 5×10^5 個/0.1ml PBS と KLM-1 10^5 個/0.1ml PBS を混合してヌードマウスに接種し (PBMC 群)、LAK 群と同様に接種当日から 3 日間 rIL-2 を腹腔内投与した。経時的に出現する腫瘍径を測定し腫瘍体積および増殖抑制率を求めた。

【結 果】

培養前の健常人末梢血単核球の NK 活性は平均 26.1%, LAK 活性 7.1%, 膀胱癌細胞障害活性は 15.3%であったが、培養 4 日目ではそれぞれ 86.6%, 90.2%, 44.9%, 培養 7 日目では 75.7%, 69.8%, 83.6%と細胞障害活性が誘導され (effector/target 比=20 : 1), かつ膀胱癌細胞に対する細胞障害活性は 7 日目で最大となった。膀胱癌症例で成分採血装置を用いて得たリンパ球から誘導した LAK 細胞の細胞障害活性は effector/target 比が 20 : 1 では NK 活性は 77.9%, LAK 活性は 72.9%, 膀胱癌培養細胞 PK-1, PK-9, KLM-1 に対しては 86.4%, 36.7%, 23.2%と、高い細胞障害活性を示した。膀胱癌症例の末梢血単核球を健常人の場合と同様に固層化抗 CD3 抗体を用いて培養したところ、細胞障害活性は NK 活性 36.5%, LAK 活性 42.1%, 膀胱癌細胞 PK-1, PK-9, KLM-1 に対しては 6.5%, 12.7%, 23.5%という結果であったが、固層化抗 CD3 抗体を用いないで培養した場合、NK 活性 73.1%, LAK 活性 63.8%, 膀胱癌細胞に対しては 26.8%, 12.3%, 52.9%と高い活性が誘導された。PBMC 群では対照群と有意差はなかったのに対して、LAK 群では腫瘍の出現がほとんど認められなかった。腫瘍増殖抑制率を求めると、PBMC 群の腫瘍増殖抑制率は 10%から 40%程度に留まったのに対して、LAK 群ではほぼ 100%の増殖抑制率を示した。

【ま と め】

in vitro の assay では健常人のみならず膀胱癌症例の末梢血単核球からも高い細胞障害活性を有する LAK 細胞が誘導できることが確認された。活性の高い LAK 細胞誘導には成分採血装置を用いて大量にリンパ球を得て、これを IL-2 で活性化するのが良いと思われた。また、ヌードマウス皮下移植膀胱癌モデルでも、腫瘍の増殖を強く抑制し in vivo でも細胞障害活性を期待できると考えられる。

審 査 結 果 の 要 旨

近年、諸家の努力により膀胱癌の切除率は改善したが、拡大郭清を伴う切除術など術式の改良によっても遠隔成績は思ったほどには改善していない。そのため、膀胱癌の予後の向上のためには外科的手術療法のみではなく、放射線療法、化学療法、免疫療法などを併施する集学的治療が必要とされている。しかし、確実に有効といえる治療法は確立されていないのが現状で、膀胱癌に有効な治療法の確立のためにはそれぞれの治療法をより有効性の高いものへと改良していくことが必要である。

これに対して近年の免疫学の進歩には著しいものがあり、生体内の免疫機構の解明と、それに関わる様々なサイトカインの単離、合成が実現したことで従来では考えられなかった免疫療法が試みられている。本論文が取り上げた悪性腫瘍に対する免疫療法もサイトカインの発見と合成が実現して現実のものとなった。本論文は膀胱癌細胞に対する免疫療法の効果について、実験的検討を行っている。リンパ球を IL-2 の存在下で培養して誘導した LAK 細胞は膀胱癌も含めて様々な腫瘍細胞に対して細胞障害活性を発揮することは既に確認されている。しかし、臨床応用する際にはいろいろ解決しなければならない問題がある。膀胱癌患者から得たリンパ球から細胞障害活性を持つ LAK 細胞が誘導できるか、誘導した細胞をいかにして腫瘍細胞と接触させるか、腫瘍細胞と接触した細胞が機能を発揮できるかなど、どの段階が欠けても治療法として成立しない。本論文は悪性腫瘍に対する免疫療法を臨床応用するに当たって、確認しておかなければならない下記の点について、実験的に検討し、明らかにしている。

第一に健常人および膀胱癌患者のリンパ球をフラスコ内で IL-2 存在下で培養した LAK 細胞は膀胱癌培養細胞に対する細胞障害活性を持つこと、第二に採血方法、誘導方法によって誘導された LAK 細胞の細胞障害活性に差があること、第三に誘導した LAK 細胞を腫瘍細胞と接触させた状態でヌードマウス皮下に移植すると、腫瘍の増殖が強く抑制されること、を示した。この本論文の結果は、膀胱癌患者のリンパ球を採取し、IL-2 存在下で培養して誘導した LAK 細胞を、適切な方法で投与することにより LAK 細胞と腫瘍細胞を接触させることができれば、LAK 細胞を用いた養子免疫療法が悪性腫瘍に対する有効な治療法として成立し得ることを示している。いかにして LAK 細胞を腫瘍細胞に接触させるか、言い換えればいかにして腫瘍集積性を高めるかという問題は今後、解決しなければならないが、ヒトの膀胱癌細胞に対するヒトの LAK 細胞の腫瘍増殖抑制効果が確認された本論文の結果は、今後、免疫療法の臨床応用を検討するにあたって、基礎を成す重要なものであり、本論文は学位に値する。